GS2-2-3

組織酸素消費量計測法開発のための研究

Development of experimental setup to measure the tissue oxygen consumption

〇澤田小夜（芝浦工業大学大学院），柴田政廣（芝浦工業大学），渡邉宣夫（芝浦工業大学）

Sayo SAWADA, Shibaura Institute of Technology
Masahiro SHIBATA, Shibaura Institute of Technology
Nobuo WATANABE, Shibaura Institute of Technology

Abstract: Tissue is consuming the oxygen at all times. In other words, the life activities are closely related to the oxygen. However, few conventional studies concerning the tissue oxygen consumption were performed. The other sides, several studies about the oxygen consumption at the molecular level were reported. The diagnostic method of the tissue viability is still under the research and that is leading to the criterion judgment for the joint surgery of amputated limb. The evaluation of the tissue oxygen consumption is the possible its candidate. We firstly developed an experimental system in which the tissue oxygen consumption level can be indirectly measured by the change in the dissolved oxygen concentration level. The preliminary study using this system showed the different oxygen consumption level between the healthy and non-healthy skeletal muscles, which is suggesting the feasibility of our proposing method.　**Key Words: Tissue oxygen consumption, Tissue viability**

1. 研究背景

酸素は生命活動を維持する上で最も重要な物質であることに疑いの余地はない．今日，分子生物学の発展に伴い，細胞レベルにおける酸素消費量の計測法が数多く算出されている．燐光を用いた蛍光イメージングはその一例として挙げられる．一方，組織レベルでの酸素消費量の測定に関する報告は少ない。酸素消費量計測は,生体組織の活動度，すなわちバイアビリティー診断に応用可能と我々は考えた．

そこで我々は、特別な装置や手技を必要とせず，一般的な研究室で利用可能な組織酸素消費量計測システムを構築し、その妥当性を検証することを本研究の目的とした．

2. 方法

2.1　組織酸素消費量計測装置開発コンセプト

① 密閉容器内に満たされた液体中の溶存酸素量を計測する．なお、組織への酸素移動量は，溶液中の溶存酸素量変化から間接的に算出出来る仕組みである．
② 体温環境下を再現する．(37[℃])
③ pH を同時計測する．
④ 溶存酸素量の計測は、隔膜電極式センサを使用する [1]．
⑤ 一般的な研究室で利用可能な簡便な装置とする．

3.2　酸素消費量計測システム構築

酸素消費量計測装置システム設計案を以下 Fig.1 に示す．セパラフラスコと恒温槽を，タイゴンチューブを用いて連結させ，閉流路を作る．セパラフラスコ内には体積定義した AirSaturationO_2PBS 溶液を含むメスシリンダーを挿入し，閉流路を流れる温水によって，溶液を 37[℃]に維持する．また，Fig.1①・②メスシリンダーに組織，溶存酸素量計測器・pH 計測器を各々挿入し，メスシリンダー口をラップフィルムとタイラップ®を用いて，外部酸素と遮断することで密閉環境を構築した．これより，溶存酸素量の連続計測を可能とした．上記を具体化した物を Fig.2 に示す．
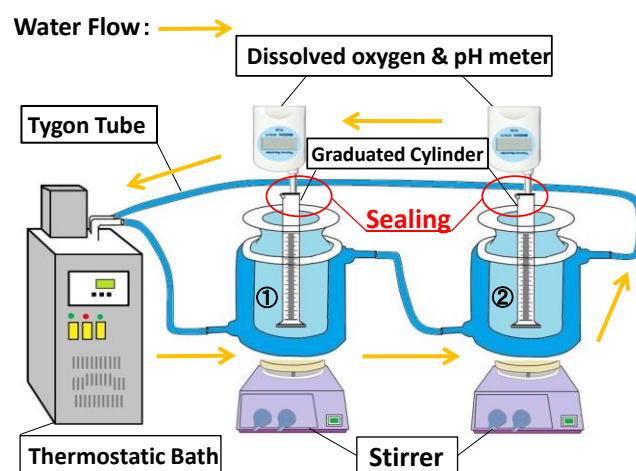
Fig.1 Design proposal diagram of the system
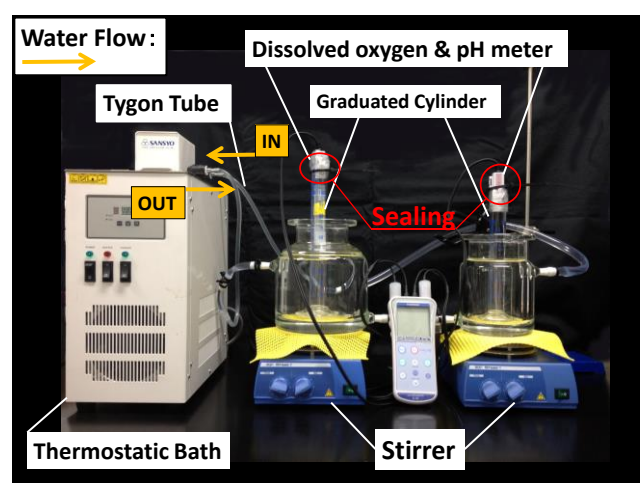
Fig.2 Oxygen consumption measurement system

3.3　酸素消費量計測システム妥当性評価実験

構築した酸素消費量計測システムにおいて，3.1 項に示す開発コンセプトを達成しているか妥当性評価実験を行った．溶存酸素量計測においては，特に装置の密閉性を確実に維持しているかを評価することを目的に実験を行った．ここでは組織を用いない事で，容器内外からの酸素流入がないかに着目した．

また，pH 計測に関して，実験環境の生理的条件が満たされているかを評価することを目的に実験を行った．実験を行うにあたり，堀場製作所発行飽和溶存酸素量 [1]を参考に，温度に対する飽和溶存酸素量理論式（ⅰ）を算出した．また，pH は使用する溶液の規格を理論値（ⅱ）とした．

$Y=0.0037X^2-0.3279X+13.917$　…（ⅰ）

pH=5.4（日本薬局方　注射用大塚蒸留水）…（ⅱ）
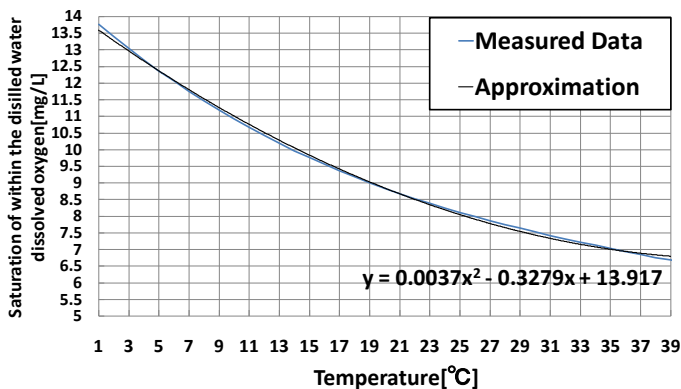
Fig.3 The Saturation O_2 inside the distilled water as the function of Temperature which was given by the sensor manual[1].

我々が構築した実験装置を用いて組織なしでまずは密閉された環境下における PBS 中の酸素濃度が経時的にも Fig.3 に示された溶存酸素量理論値（6.85[mg/L]）と計測値が一致すれば，計測システムは妥当であると判断できる．この評価実験は大気圧環境かつ 37[℃]にて行った．

3.4　酸素消費量計測システム妥当性評価実験結果

妥当性評価実験として、密閉容器中の PBS 溶液内の経時的な温度と溶存酸素量の時間的推移 Fig.4 に、密閉容器中の温度と pH 値の時間的推移を Fig.5 にそれぞれ示す．ここでは体温環境下で飽和溶存酸素量として初期設定した結果である．
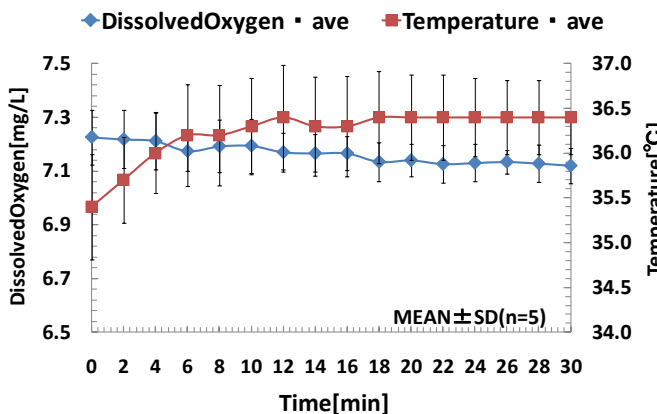
Fig.4 Time series of Dissolved Oxygen concentration level and temperature inside the oxygen saturated PBS solution.
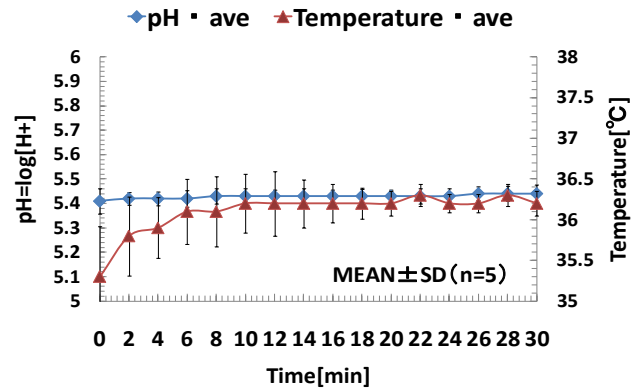
Fig.5 E Time series of pH level and temperature inside the oxygen saturated PBS solution

3.5　妥当性評価実験結果に対する考察

妥当性評価実験において，使用した溶存酸素計測器の許容誤差は±0.2[mg/L][1]，また pH の許容誤差は±pH0.02[1]である．Fig.4 より，溶存酸素量に関して算出値と理論値には最大 0.5[mg/L]の差が生じる結果となった．これより，構築したシステム全体の許容誤差を±0.5[mg/L]とし，それ以上の溶存酸素量の変化を，算出値として定める事とした．また Fig.5 より，pH に関しては算出値が理論値とほぼ一致している事より，pH 計測器本来の許容誤差を考慮した上で，算出値として定める事とした．ここで，Fig.4・Fig.5 共に，実験開始 0[min]～6[min]において，温度が定まっていない事がわかる．これは，溶媒が設定温度に達していても，電極が常温保存されている状態で使用していた為，電極自体を温める為に費やす温度変化であると判断する．この結果より更なる再現性を考慮すれば，計測前に電極を挿入する前に設定温度 37[℃]にしておく手法をとることでこの問題は解消可能と考える．これらを考慮した上で，算出値と理論値が，溶存酸素量，pH 値両者ともに理論値と漸近したことから，構築した計測装置システムは妥当と判断した．

3. 組織酸素消費量計測実験

構築した酸素消費量計測システムを用いて，鮮度に差があるラット骨格筋の酸素消費量と pH を，各々計測した．

3.1　組織酸素消費量計測実験方法

構築した酸素消費量計測システムを用いた．大気圧下において AirSaturationO_2PBS 溶液 100[ml]を 37℃に維持し，ラット下肢 3[g]を挿入・密閉した．加えて，組織は各実験に対し同一個体から摘出した．これより，PBS 溶液中の溶存酸素量の変化から，間接的に組織の酸素消費量を計測した．使用した下肢には，死後経過時間に差を設けた 2 種類を各々実験対象とし，その違いを算出した．1 つは死後 30 分以内の下肢骨格筋とし，1 つは死後 90 時間以降の下肢骨格筋とした．各々の時間設定の理由として，前者は死後硬直が開始する前である事 [2]，後者は被検体に処置を施してもが蘇生が確認されず，死後硬直が完全に緩和されている事が挙げられる．

3.2　組織酸素消費量計測実験結果

3.2.1　鮮度の良い組織における計測実験結果

上記 4.1 項に示した条件のもと，死後 2 時間以内のラット下肢骨格筋の酸素消費量，pH を以下 Fig.6・Fig.7 に示す．ここでは Fig.6 を設定温度に対する酸素消費量とし，

Fig.5 を設定温度に対する pH 値として示している．
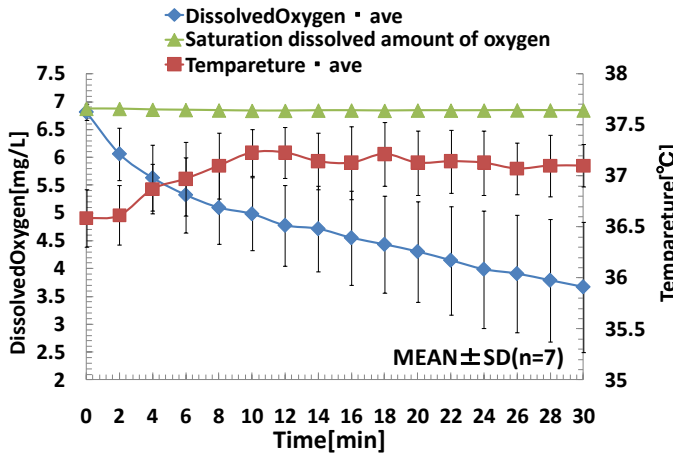
Fig.6 Time series dissolved oxygen concentration level within the PBS solution in which contains the fresh skeletal muscle as the positive control study
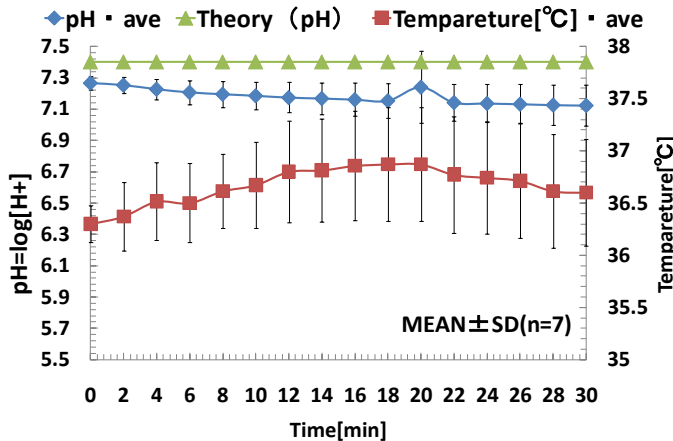
Fig.7 Time series pH level within the PBS solution in which contains the fresh skeletal muscle as the positive control study

3.2.2 鮮度の悪い組織における計測実験結果

上記 4.1 項に示した条件のもと，死後 24 時間以降のラット下肢骨格筋の酸素消費量, pH を以下 Fig.8･Fig.9 に示す．ここでは Fig.8 を設定温度に対する飽和溶存酸素量とし，Fig.7 を設定温度に対する pH 値として示している．
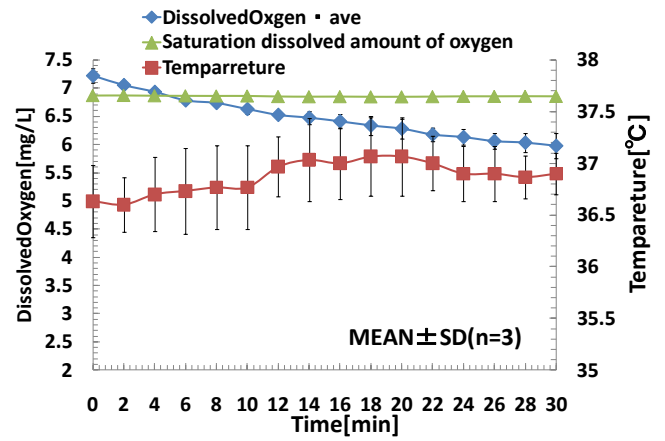
Fig.7 Time series dissolved oxygen concentration level within the PBS solution in which contains the non-fresh skeletal muscle
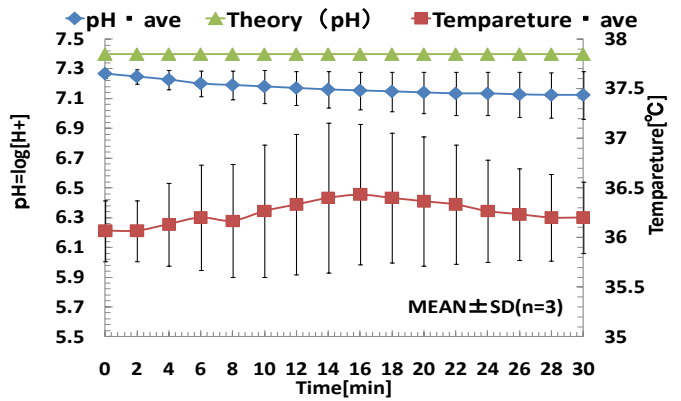
Fig.8 Time series pH level within the PBS solution in which contains the non-fresh skeletal muscle

4.5 組織酸素消費量計測実験考察

4.5.1 組織酸素消費量

組織の鮮度による酸素消費量の差を比較した．以下 Fig.9 より，組織の鮮度の違いによって，酸素消費量は異なる事が明らかになった．37[℃]時の飽和酸素溶存量に対し，鮮度の良い骨格筋では平均 3.14[mg/L]酸素が減少した事に対し，鮮度の悪い骨格筋では平均 1.24[mg/L]しか減少しなかった．また，鮮度の良し悪しで，最大 3.55[mg/L]の酸素減少の差が生じた．これより，組織の鮮度が良いほど酸素消費量が多く，鮮度が悪いほど，組織が消費する酸素量は少ないことが分かった．また，“鮮度が良い”・“鮮度が悪い”の 2 群にわけ，酸素消費量の平均値を算出したところ，鮮度が良い群で 3.14[mg/L]，鮮度が悪い群で 1.24[mg/L]となった．2 つの平均値の差が，統計的に意味のある差であるかを検定するため，t 検定を行った．その結果，鮮度が良い群の平均値が有意に大きいという結果になった（t=2.6, df=8, p<0.05）．
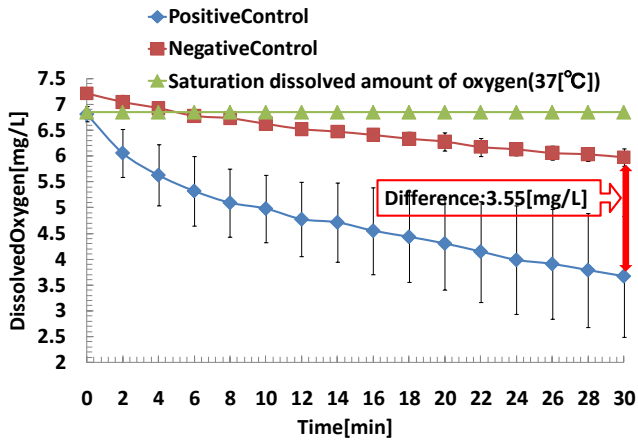
Fig.9　Comparison of oxygen consumption level between the fresh and non-fresh skeletal muscle, which was indirectly measured through the measurement of the dissolved oxygen concentration
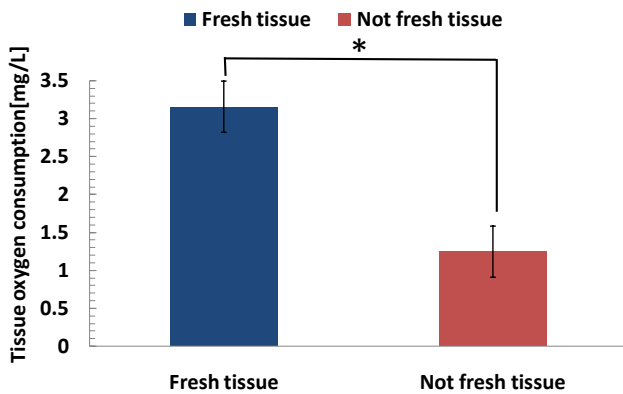
Fig.10　The result of statistical significance test (student-t test) (*:P<0.05)

4.5.2　PBS 溶液中の pH 値について

組織の鮮度による pH の差を比較した．死後硬直の開始に伴い，組織の代謝方法が好気呼吸から嫌気呼吸に変わる事は一般的に知られている [3]．嫌気呼吸では，筋肉中の ATP が消費され，乳酸が生じる．つまり，死後経過時間が長いと，組織の pH は酸性に傾くと考えられる．しかし，以下 Fig.11 より，算出 pH 値は，鮮度の良し悪しに関係なく，ほぼ一定値を示していることが分かる．これより，装置内の pH は生理的環境に常に保たれ，組織の酸素消費に影響を与える因子は無かったと言える．
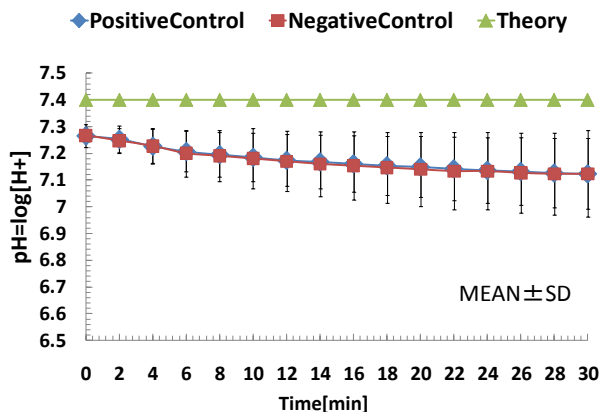
Fig.11　Comparison of pH value between the positive and negative controls

4. 結論

死後直後の骨格筋と，死後 90 時間以上経過した骨格筋では，酸素消費量に最大 3.55[mg/L]の差が生じた．これより，我々が構築した実験システムは、組織酸素消費量を計測できる可能性が示された。

5. 参考文献

(1) 株式会社堀場製作所，Navi *h* pH 取扱説明書，P182・P184・P185
(2) 鈴木信夫，実験動物の基礎と技術　技術編 P55
(3) 小澤美奈子ら，インテーグレッドシリーズ 1 生化学，P199